



Universidade Federal Rural de Pernambuco

Departamento de Pesca e Aquicultura

Curso de Engenharia de Pesca

**Investigação da susceptibilidade do *Macrobrachium rosenbergii* ao Vírus da Mionecrose
Infecciosa (IMNV) através de infecção experimental**

Scarlatt Paloma Alves da Silva

Recife, 2019

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Departamento de Pesca e Aquicultura

Curso de Engenharia de Pesca

Investigação da susceptibilidade do *Macrobrachium rosenbergii* ao Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV) através de infecção experimental

Scarlatt Paloma Alves da Silva

Trabalho de conclusão de curso da área de sanidade de animais aquáticos, apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco, *Campus* Sede, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Pesca, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.

Recife, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586i Silva, Scarlatt Paloma Alves da
Investigação da susceptibilidade do *Macrobrachium rosenbergii* ao vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) através de infecção experimental / Scarlatt Paloma Alves da Silva. – 2019.
26 f.: il.

Orientadora: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências.

1. Camarão – Doenças 2. Camarão – Virus
3. *Macrobrachium rosenbergii* 4. Camarão – Infecções 5. Virologia Veterinária I. Silva, Suzianny Maria Bezerra Cabral da, orient.
II. Título

CDD 639.3

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Departamento de Pesca e Aquicultura

Curso de Engenharia de Pesca

Scarlatt Paloma Alves da Silva

Investigação da susceptibilidade do *Macrobrachium rosenbergii* ao Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV) através de infecção experimental

Monografia apresentada ao Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, *Campus* Sede, como requisito para a obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Pesca.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva / DEPAq – UFRPE

Orientadora

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos / DMV – UFRPE

Membro Titular

Msc. Elizabeth Pereira dos Santos / DEPAq – UFRPE

Membro Titular

Prof. Dr. Luis Otávio Brito da Silva/ DEPAq – UFRPE

Membro Suplente

Dedico esta monografia a pessoa mais importante da minha vida, Djanira, minha Mãe. Pela dedicação, paciência, por todo apoio e amor incondicionais, e por sempre acreditar em mim e nos meus sonhos.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, saúde e paz para seguir meus sonhos.

A UFRPE, pelas oportunidades profissionais geradas e pela formação acadêmica.

Ao PET Pesca, pela concessão da bolsa durante o curso.

A Prof^a. Dr^a. Suzianny M^a. B. Cabral da Silva pelos ensinamentos prestados, orientação, paciência, confiança em mim depositada e, sobretudo, pela amizade.

Ao coordenador da Estação de Aquicultura Continental Johei Koike, Prof. Dr. Dijaci Araújo Ferreira, pela parceria e cordialidade para a realização do experimento.

Aos Professores, técnico-administrativos e demais funcionários do Departamento de Pesca e Aquicultura, por todo aprendizado e colaboração ao longo dos anos.

A banca examinadora, Prof. Dr. Fernando Leandro e Msc. Elizabeth Pereira, pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Aos amigos formados no PET-Pesca, especialmente ao tutor Paulo Guilherme Vasconcelos de Oliveira, que sempre foi um amigo pessoal e incentivador da vida profissional.

Aos amigos que estiveram sempre ao meu lado, nos melhores e piores momentos, em especial (e ordem alfabética): Clebson Marçal, Clodoaldo Siqueira, David Bruzaca, José Filipe, Isabela Marques, João Albuquerque, Leilane Gomes, Lucas Santos, Maria Carolina, Nelson Gomes, Theresa Bella e Túlio Temóteo.

A Gênisson Carneiro, meu namorado e parceiro de todas as horas, pelo apoio, companheirismo e dedicação.

A minha amiga de longa data e comadre, Isabela Barbosa, por toda amizade e carinho.

A minha irmã Djan Alves e minha cunhada Joana Santana por sempre me apoiarem em todos os momentos.

A todos que de alguma maneira contribuíram de forma positiva ao longo da minha graduação e para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

E, por último, mas não menos importante, a Djanira Alves, minha Mãe, pela dedicação, paciência, por todo apoio e amor incondicionais, por sempre acreditar em mim e nos meus sonhos e por quem dedico todos os meus esforços.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar
sobre ombros de gigantes”*

Isaac Newton

Resumo

A aquicultura é o setor de produção de alimento que mais cresce no mundo. No Brasil, o cultivo de camarão é responsável por quase 20% da produção nacional de aquicultura. Embora essa atividade tenha sido iniciada na década de 1970 com o cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, o cultivo de camarão de água doce, *Macrobrachium rosenbergii*, é algo crescente no país. Mesmo que ainda não se tenha dados recentes a nível nacional, o *M. rosenbergii* já representa cerca de 3% da produção global de crustáceos e está numa crescente quanto à sua produção comercial. Isso implica no surgimento de uma série de problemas na cadeia produtiva, entre um dos principais pode-se destacar o surgimento de doenças, já que elas são capazes de causar grandes perdas econômicas, além de impactarem diretamente o meio ambiente. Diante dessa problemática, o objetivo do trabalho é investigar a susceptibilidade do camarão *M. rosenbergii* ao Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) através de inoculação intramuscular com posterior determinação da infecção via nested-PCR e lesões sugestivas por histopatologia. Para a realização do estudo foram adquiridos 54 camarões e estes foram divididos de acordo com a fase de vida (Grupo 1 = subadultos e Grupo 2 = adultos) e posteriormente infectados com IMNV por via intramuscular. Dentro de cada grupo, foi reservada uma parcela de animais que não foram infectados com o vírus, receberam apenas uma injeção de solução salina e foi denominado de Controle Negativo. A exposição ao vírus durou 21 dias e teve acompanhamento diário das variáveis de qualidade de água e das mortalidades ao longo do tempo. Depois de decorridos os 21 dias de experimento, os animais foram submetidos a diagnóstico confirmatório de infecção ao IMNV através de nested-PCR e análise histopatológica. Todas as variáveis de qualidade de água analisadas, foram submetidas à análise estatística, seguindo os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett) foi feita a análise variância (ANOVA) e o teste t de *student* usando o programa RStudio (versão 3.6.1) e com exceção do pH e da amônia, as demais variáveis de qualidade de água (nitrito e temperatura) não diferiram estatisticamente entre si. Os dados obtidos na nested-PCR e mortalidade foram submetidos a estatística descritiva. Todos os animais inoculados intramuscularmente com IMNV, subadultos e adultos de *M. rosenbergii*, foram positivos via nested-PCR, confirmando a sensibilidade desta espécie ao Vírus da Mionecrose Infecciosa.

Palavras-chave: Bioensaio. Gigante da malásia. Infecção. Mionecrose. Camarão.

Abstract

Aquaculture is the fastest growing food production sector in the world. In Brazil, shrimp farming accounts for almost 20% of national aquaculture production. Although this activity began in the 1970s with the cultivation of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*, the cultivation of freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*, is growing in the country. Even though recent national data are not yet available, *M. rosenbergii* already accounts for about 3% of global crustacean production and is increasing in commercial production. This implies the emergence of a series of problems in the production chain, one of the main ones can be highlighted the emergence of diseases, as they are capable of causing great economic losses, as well as directly impacting the environment. Given this problem, the objective of this work is to investigate the susceptibility of shrimp *M. rosenbergii* to Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) through intramuscular inoculation with subsequent determination of infection via nested-PCR and lesions suggestive by histopathology. For the study, 54 shrimps were acquired and divided according to life stage (Group1 = subadults and Group 2 = adults) and subsequently infected with IMNV intramuscularly. Within each group, a portion of animals that were not infected with the virus were reserved, received only one injection of saline and was called Negative Control. Exposure to the virus lasted 21 days and was monitored daily for water quality and mortality over time. After 21 days of the experiment, the animals were submitted to confirmatory diagnosis of IMNV infection through nested-PCR and histopathological analysis. All water quality variables analyzed were subjected to statistical analysis, following the assumptions of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity (Bartlett). Variance analysis (ANOVA) and Student's t-test were performed using the RStudio program (version 3.6.1) and except for pH and ammonia, the other water quality variables (nitrite and temperature) did not differ statistically. The nested-PCR data and mortality were submitted to descriptive statistics. All animals inoculated intramuscularly with IMNV, subadults and adults of *M. rosenbergii*, were positive via nested-PCR, confirming the sensitivity of this species to Infectious Myonecrosis Virus.

Keywords: Bioassay. Malaysian Giant. Infection. Myonecrosis. Shrimp.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Layout da distribuição das unidades experimentais.....	14
Figura 2 – Distribuição da mortalidade de todos os indivíduos ao longo dos dias de experimento.	18
Figura 3 – Detecção de IMNV via nested-PCR	20
Figura 4 – Cortes histológicos	21

Lista de Tabela

Tabela 1. Variáveis de qualidade de água durante o experimento: Valores médios, mínimos e máximos.....	19
Tabela 2. Amplicons de 1ª e 2ª PCRs (nested-PCR) para IMNV em subadultos e adultos de <i>M. rosenbergii</i>	21

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Objetivo.....	12
3. Material e métodos	13
3.1. Delineamento experimental	13
3.2. Análise de variáveis de qualidade de água	14
3.3. Preparação da solução salina	14
3.4. Preparação do inóculo.....	14
3.5. Infecção experimental com IMNV	15
3.6. Análises laboratoriais.....	15
3.6.1. Extração de RNA	15
3.6.2. Concentração e relação $A_{260/280}$ do RNA total	15
3.6.3. Síntese de cDNA	16
3.6.4. Nested-PCR.....	16
3.7. Análise estatística	17
4. Resultados e Discussão.....	17
5. Conclusão	22
Referências Bibliográficas.....	23

1. Introdução

A aquicultura é o setor de produção de alimento que mais cresce no cenário mundial, embora já não mostre taxas de crescimento tão altas quanto às da década de 1980 e 1990 (FAO, 2018). Segundo o IBGE (2016), a aquicultura brasileira teve uma produção de R\$ 4,61 bilhões, sendo a maior parte (70,9%) oriunda da criação de peixes, seguida pela criação de camarões (19,3%).

No Brasil, a produção de camarão marinho foi iniciada na década de 1970, na região Nordeste (ROCHA, 1998) e, em 2015, o cultivo de *Litopenaeus vannamei* aumentou 7,4% em relação a 2014, e a região Nordeste foi a principal responsável por esse crescimento, pois contribuiu com quase a totalidade da produção nacional (99,3%) (IBGE, 2015). Em termos de carcinicultura continental, embora não existam dados recentes da produção de *Macrobrachium rosenbergii* no Brasil, de acordo com a FAO (2018), esta espécie representou 3% da produção total de crustáceos a nível global no ano de 2016. O *M. rosenbergii* é uma espécie da ordem decápoda, que habita águas doces e salobras e que está distribuído naturalmente na região costeira da Índia ao Vietnã e no oceano Pacífico, nas proximidades das Filipinas, Nova Guiné e Austrália do Norte (FAO, 1980). Ainda segundo a FAO (2018), o *M. rosenbergii* tem tido um crescimento na sua produção em relação aos anos anteriores, não só pelo seu potencial zootécnico, como também pelo valor agregado a sua proteína produzida, o que a torna uma espécie cada vez mais valorizada economicamente.

Esse fenômeno produtivo está em constante desenvolvimento na Região Nordeste do Brasil, não só devido às condições climáticas extremamente favoráveis para a espécie *M. rosenbergii*, como também pelo ótimo potencial zootécnico da espécie (ABCC, 2013). Contudo, tal difusão em todo o Brasil, tem gerado cada vez mais cultivos intensivos, com uma maior densidade de estocagem, em busca de uma maior produtividade, e isso tem provocado o aparecimento de diversas doenças na carcinicultura (ROCHA, 2007).

Sabe-se que os principais agentes patogênicos conhecidos por causarem elevada mortalidade em crustáceos são vírus e bactérias, alguns destes são de declaração obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e são capazes de provocar perdas recorrentes no setor produtivo e que podem, até mesmo, dizimar os animais de uma fazenda ou região quando infectados (OIE, 2018).

Uma das principais doenças que acometem crustáceos peneídeos e que podem impactar negativamente a condição sanitária do país, a sustentabilidade da cadeia

produtiva e a fauna brasileira de animais aquáticos é a Mionecrose Infecciosa (IMN), que é uma doença que faz parte da lista de doenças de notificação obrigatória do Serviço Veterinário Obrigatório (SVO), portanto, é considerada de interesse nacional (CNA, 2019).

A Mionecrose Infecciosa tem uma etiologia viral causada pelo Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), um vírus de RNA pertencente à família Totiviridae, que acomete os crustáceos e possui grande resistência aos métodos mais comuns de desinfecção em uso na aquicultura, como a secagem e a cloração (OIE, 2018). Camarões jovens e subadultos marinhos são os mais sensíveis, tendo como principal hospedeiro o *L. vannamei* (CNA, 2019). Ainda de acordo com a CNA (2019), o vírus foi identificado inicialmente no nordeste do Brasil diante de uma série de surtos em fazendas de camarão. As espécies susceptíveis são: *Penaeus monodon* e *Litopenaeus stylirostris*, que apresentaram sensibilidade em ambiente experimental e *Litopenaeus vannamei*, em ambiente natural (CNA, 2019), não existindo até o presente momento, relatos de infecção em *M. rosenbergii*.

Para verificar a infecção de um organismo a um determinado agente patogênico, se faz necessário a detecção de uma sequência de ácidos nucleicos característica desse agente, no corpo do hospedeiro, através da reação em cadeia polimerase em duas etapas (nested-PCR), que nada mais é do que uma PCR convencional, que tem a origem do material genético derivada de uma reação anterior, aumentando a sensibilidade e especificidade da análise, já que faz uso de *primers* mais internos (WILCZYNSKI, 2009).

2. Objetivo

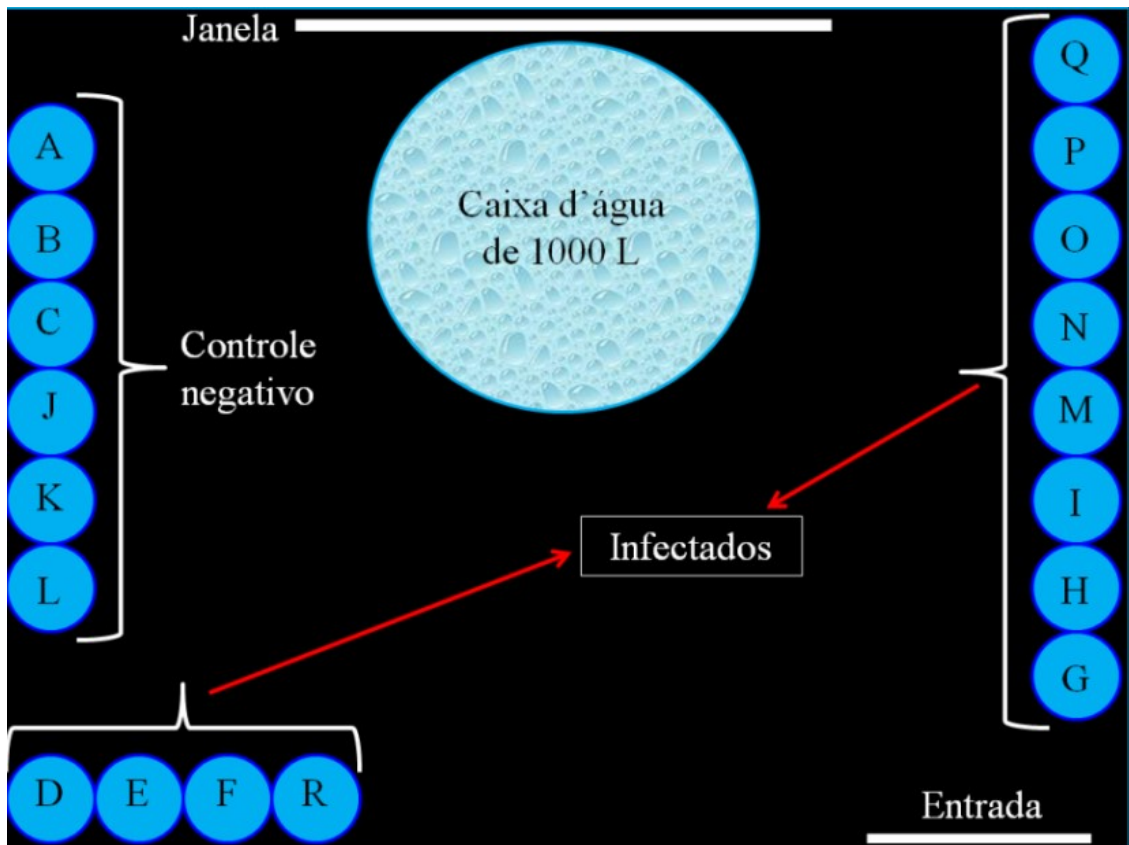
Investigar a susceptibilidade do camarão *Macrobrachium rosenbergii* ao IMNV através de inoculação intramuscular com posterior determinação da infecção via nested-PCR e lesões sugestivas por histopatologia.

3. Material e métodos

3.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado na Estação de Aquicultura Continental Johei Koike do Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para a realização do bioensaio foi utilizado um total de 54 camarões classificados em dois grupos de pesos diferentes, sendo o grupo 1 (5–15 g) e o grupo 2 (16–26 g), classificados respectivamente como subadultos e adultos (ZIMMERMANN, 1998), todos adquiridos na própria Estação de Aquicultura Continental Johei Koike. Esses animais foram distribuídos em baldes com capacidade total de 20 L e volume útil de 15 L, com a densidade de 3 camarões para cada unidade experimental, com aeração constante, alimentados com ração comercial (35% PB) a uma taxa de 3% da biomassa total ao dia, numa frequência de 4 vezes ao dia (SEBRAE/ES, 2005). Para cada grupo existiu três unidades experimentais como controles negativos (grupo 1: “A”, “B”, “C” e grupo 2 “J”, “K”, “L”) (Figura 1), ou seja, animais que não foram infectados com o IMNV, apenas receberam uma injeção (100µL) de solução salina a 0,85%. Os demais animais das unidades experimentais (grupo 1: “D”, “E”, “F”, “G”, “H”, “I” e grupo 2: “M”, “N”, “O”, “P”, “Q”, “R”) (Figura 1) foram infectados via injeção (100µL) com o inóculo do IMNV. A exposição ao vírus durou 21 dias, sendo a mortalidade acompanhada diariamente e pôde contar com o uso de 18 baldes como unidades experimentais, 1 caixa d’água de 1000 L para armazenar água de abastecimento doméstico previamente declorada via aeração constante por 48 horas e correção de alcalinidade para 50 ppm de CaCO₃ com bicarbonato de sódio, cuja função era repor a água das unidades experimentais, de modo a manter a alcalinidade sempre tamponada, e 1 caixa d’água de 1000 L para armazenar a água proveniente da sifonagem diária dos resíduos sólidos do fundo dos baldes, e conseqüentemente auxiliar a manutenção da qualidade água, mas sem ultrapassar o limite de 20% de renovação diária, que era equivalente a 3 L.

Figura 1 – Layout da distribuição das unidades experimentais



Fonte: Autoral

3.2. Análise de variáveis de qualidade de água

A temperatura foi aferida todos os dias, nos turnos da manhã e da tarde com o auxílio de um termômetro analógico. Já a amônia (NH_3), o pH e o nitrito (NO_2^-) foram aferidos três vezes na semana através de testes colorimétricos comerciais. A alcalinidade foi analisada uma vez na semana através de titulação (FUNASA, 2009).

3.3. Preparação da solução salina

A solução foi obtida através da diluição de 0,425 g de cloreto de sódio (NaCl) em 50 mL de água destilada e teve como concentração final 0,85%. Todo volume foi esterilizado com o filtro de seringa da KASVI (modelo K18-230) contendo porosidade de 0,22 μm .

3.4. Preparação do inóculo

Para preparar o inóculo viral a ser injetado nos animais, foi usado um isolado na concentração final de $1,1 \times 10^3$ cópias de IMNV/ μg de RNA, que estava mantido a -80°C , conforme descrito por Silva et al. (2015). Antes da inoculação, este material foi filtrado para esterilização com o filtro de seringa da KASVI (modelo K18-230) contendo porosidade de 0,22 μm . A presença do IMNV no

inóculo foi também confirmada através de nested-PCR (POULOS e LIGTHNER, 2006).

3.5. Infecção experimental com IMNV

O procedimento de inoculação dos camarões foi realizado por via intramuscular no segundo segmento abdominal usando uma seringa de 1 mL, injetando 100 µL por animal do inóculo de IMNV, conforme descrito por Silva et al. (2015). No controle negativo, foi injetado nos animais o mesmo volume de 100 µL de solução salina estéril a 0,85%.

3.6. Análises laboratoriais

3.6.1. Extração de RNA

O RNA total foi extraído do músculo abdominal do segmento direito, aproximadamente 60 mg de tecido dos animais desafiados e dos animais do controle negativo usando TRIzol™ Reagent, adaptando ao protocolo descrito por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987). Para tal processo, inicialmente os tecidos foram macerados diretamente nos tubos eppendorfs (1,5 mL) com pistilos plásticos esterilizados com 1 mL de TRIzol™ Reagent, incubado a 25 °C por 5 minutos, adicionado 200µL de clorofórmio, levado ao vórtex por 15 segundos e deixado a 25 °C por 3 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 15000 RPM a 4 °C, com o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL estéril e adicionado 500µL de isopropanol. Incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 15000 RPM a 4 °C. Logo após, o sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol a 75% (diluído previamente com água DEPC) foi adicionado. O tubo foi homogeneizado via vórtex por 15 segundos e centrifugado a 10000 RPM por 5 minutos a 4 °C. Ao sair da centrífuga, o sobrenadante foi descartado e secou-se o precipitado por 15 minutos. Após a secagem, o RNA total extraído precipitado foi ressuspenso em 40µL de água ultrapura, com posterior incubação por 10 minutos a 60 °C. Ao final, foram armazenados imediatamente a -80 °C.

3.6.2. Concentração e relação $A_{260/280}$ do RNA total

A concentração e a relação $A_{260/280}$ do RNA total extraído foi verificada através de uma análise espectrofotométrica em 260 e 280 nm usando 2µL do RNA total no espectrofotômetro NanoVue Plus™.

3.6.3. Síntese de cDNA

Para formar o cDNA a partir do RNA total extraído se fez necessário fazer a quantificação da concentração no RNA total. A partir disso foi feito um mix composto por 0,5µg de oligo(dT)₁₅ e 300 ηgµL⁻¹ de RNA total, submetidos a 70 °C por 5 minutos e 4° C por 5 minutos. Após esse processo para finalizar a síntese do cDNA, foi utilizado o kit da ImProm-II™ Reverse Transcription System, seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi armazenado a -20 °C até ser usado na nested-PCR.

3.6.4. Nested-PCR

Todos os animais foram submetidos a nested-PCR para confirmação da infecção por IMNV. A primeira reação (1ªPCR) foi conduzida em um volume final de 25 µL usando: 2 µL de cDNA, 1x PCR Buffer, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP e 0,2 ρmoles de cada primer (4587F e 4914R, POULOS & LIGHTNER, 2006 – diagnóstico confirmatório recomendado pela OIE para IMNV). O ciclo térmico foi o mesmo descrito por Poulos e Lightner (2006) e consistiu de: 94 °C por 2 minutos, 39 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e, uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Para a 2ª PCR, uma reação de volume final de 25 µL foi preparada com: 1 µL de produto da primeira PCR, 1x PCR Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2mM dNTP e 0,2 ρmoles de cada primer (NF4725F e NR4863R, Poulos e Lightner, 2006). A 2ª PCR seguiu os seguintes ciclos térmicos: 95 °C por 2 minutos, 39 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e, uma extensão final de 72 °C por 5 minutos (POULOS e LIGHTNER, 2006). Os amplicons de ambas as reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% previamente corado com brometo de etídio. Os produtos da 1ª PCR (328 pb) e da 2ª PCR (139 pb) foram estimados com o auxílio de um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) e, em cada reação foi adicionado um controle positivo e um controle negativo, que teve o cDNA substituído por água ultrapura.

3.6.5. Histologia

Os camarões amostrados para análise histopatológica receberam um corte longitudinal e os lados da direita foram fixados e imersos em solução de Davidson AFA por 72 horas e em seguida transferidos para etanol a 70%. Os demais processos de preparação de lâminas foram executados de acordo com Lightner

(1997). Os animais selecionados para serem submetidos à análise histopatológica foram selecionados de forma aleatória, com a coleta de dois indivíduos do grupo infectado ao nono dia de infecção, e ao vigésimo primeiro dia do experimento foram coletados oito do grupo infectado e dois do controle negativo.

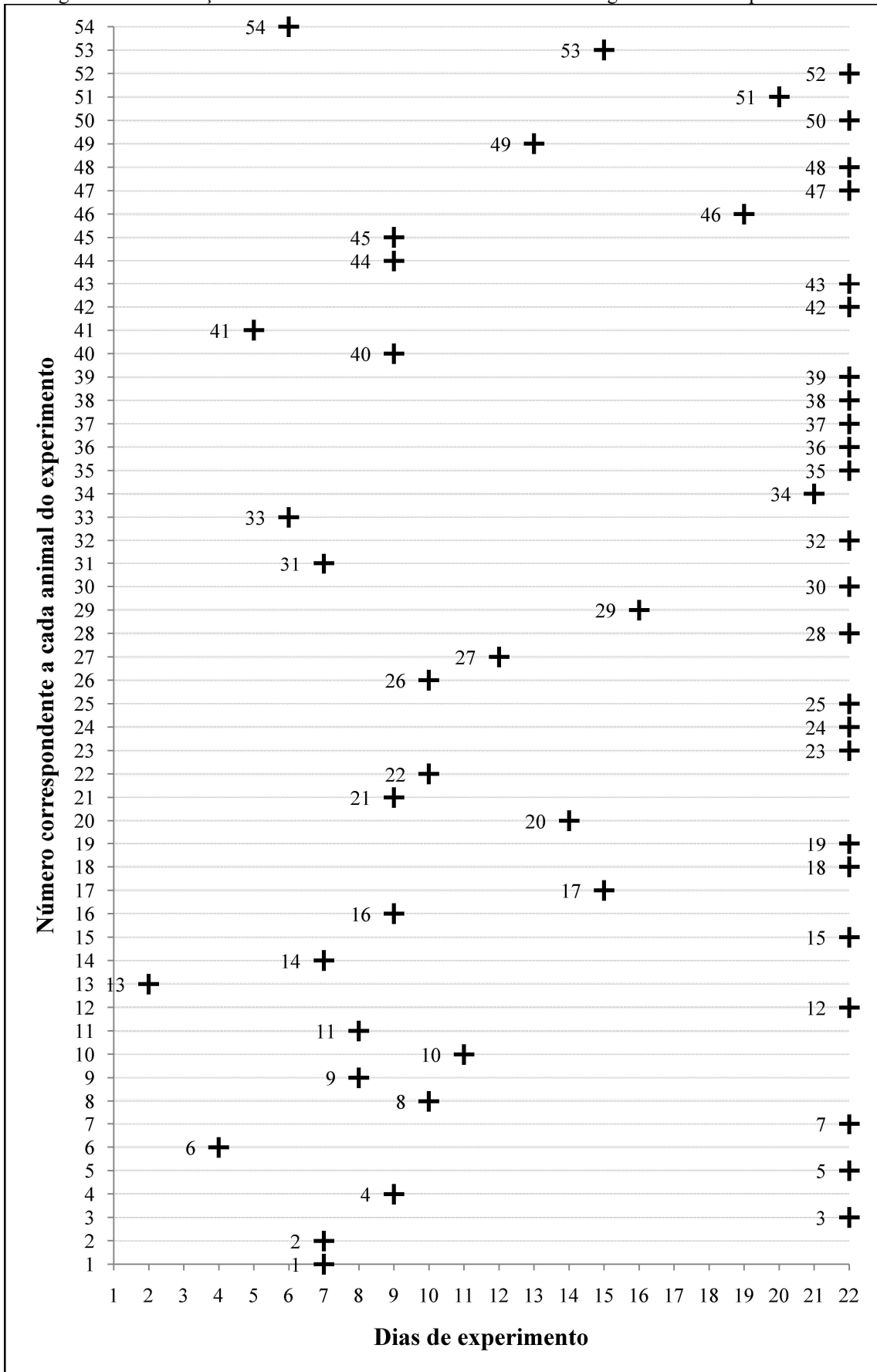
3.7. Análise estatística

Seguindo os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett), foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste t de *student* para verificar se havia diferença estatística entre os tratamentos e entre as variáveis de qualidade de água das unidades experimentais ao longo do tempo ($P \leq 0,05$). Todos os dados foram calculados usando o programa RStudio versão 3.6.1. Os dados obtidos na nested-PCR e mortalidade foram submetidos a estatística descritiva.

4. Resultados e Discussão

É possível observar a mortalidade ao longo do período de experimento (Figura 2), onde cada número de 1 a 54 representa um animal de forma individual (1 a 9 – Controle negativo subadulto; 10 a 27 – Infectado subadulto; 28 a 36 – Controle negativo adulto e 37 a 54 – Infectado adulto).

Figura 2 – Distribuição da mortalidade de todos os indivíduos ao longo dos dias de experimento.



Fonte: Autoral

Ainda de acordo com a Figura 2, as mortalidades dos indivíduos 16 e 44 no nono dia de experimento, se deram para contemplar a análise histológica. Assim como a mortalidade massiva do vigésimo segundo dia se deu para que as análises laboratoriais, tanto de nested-PCR como de histologia, fossem desenvolvidas.

Com exceção do pH e amônia, as demais variáveis de qualidade de água (nitrito e temperatura) não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1). Os valores médios de pH obtidos durante o presente experimento (Tabela 1) estão próximos aos encontrados por Huner & Brown (1985) e considerados como ideais para crescimento de adultos de *M. rosenbergii*, que ficaram entre 5 e 7.

Tabela 1. Variáveis de qualidade de água durante o experimento: Valores médios, mínimos e máximos.

Animais não infectados			Animais infectados			Todos os grupos
pH	Nitrito (N-NO ₂ - mg/L)	Amônia (N-NH ₃ mg/L)	pH	Nitrito (N-NO ₂ - mg/L)	Amônia (N-NH ₃ mg/L)	Temperatura (°C)
(média; mínimo e máximo)	(média; mínimo e máximo)	(média; mínimo e máximo)	(média; mínimo e máximo)	(média; mínimo e máximo)	(média; mínimo e máximo)	(média; mínimo e máximo)
6,96 ^a	0,01 ^a	0,49 ^a	6,85 ^a	0,09 ^a	0,98 ^a	
G1*	6,80-7,20	0,00-0,25	0,25-1,00	6,60-7,20	0,00-0,50	0,25-3,50
	6,88 ^b	0,04 ^a	0,85 ^b	6,88 ^b	0,13 ^a	1,31 ^b
G2**	6,60-7,00	0,00-0,25	0,25-2,00	6,40-7,20	0,00-1,00	0,25-3,50
						25,9 25-27

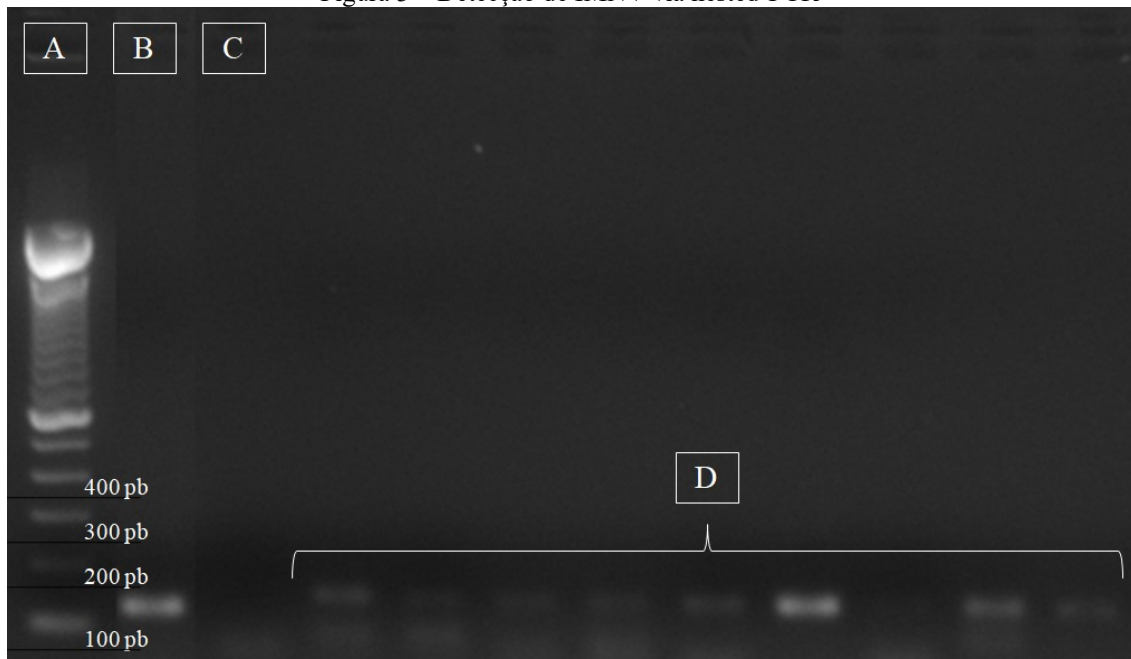
*Grupo de animais subadultos. **Grupo de animais adultos.

Os valores de temperatura do experimento estão muito próximos ao que foi relatado por Zimmermann (1998), que estima um valor ótimo para o cultivo de *M. rosenbergii* entre 26 e 32°C. Além disso, os valores máximos e mínimos de temperatura (Tabela 1) estão fora da faixa considerada extrema por Rodrigues e Zimmermann (1996) para a espécie, que seria menor que 19°C e maior que 34°C. A alcalinidade foi mantida em 50 ppm de CaCO₃, o que está dentro da faixa de 34,3 a 76,6, considerada adequada para o crescimento de *M. rosenbergii* por Melecha (1983). Para os valores de nitrito, a FAO (2002) recomenda que, para camarões de água doce, seja mantido seu valor menor que 2,00 ppm, assim como ocorrido durante todo o experimento.

Todos os animais inoculados intramuscularmente com IMNV (1,1 x10³ cópias de IMNV/μg de RNA), subadultos e adultos de *M. rosenbergii*, foram positivos via

nested-PCR, confirmando a sensibilidade desta espécie a este vírus. Na 1ª PCR foram positivos para o grupo 1 (G1 - subadultos) nove animais (Figura 3), enquanto que para o grupo 2 (G2 - adultos), foram 13 indivíduos (Tabela 2). Já na 2ª PCR foram determinados: 13 animais positivos para G1 e, 4, para G2 (Tabela 2). Em relação à ausência de infecção pelo IMNV no controle negativo (animais inoculados com solução salina a 0,85%), esta foi confirmada através da não amplificação de produtos de nested-PCR (1ª e 2ª reações) (Tabela 2). Esta metodologia mostrou-se adequada à detecção de IMNV em tecido de músculo esquelético de *M. rosenbergii* e baseia-se no procedimento descrito por Poulos e Lightner (2006) para confirmação de infecção viral em *L. vannamei*. Além disso, os presentes resultados corroboram com os achados de Silva et al (2015) em relação a rota de infecção aplicada, uma vez que, esta foi capaz de gerar infecção em *M. rosenbergii*, para ambas as classes, conforme demonstrado em indivíduos de *L. vannamei* desfiados experimentalmente com injeção intramuscular para IMNV.

Figura 3 – Detecção de IMNV via nested-PCR



Fonte: Autoral. Onde: (A) Marcador molecular de 100 pb, (B) Controle positivo composto de isolado na concentração de $1,1 \times 10^3$ cópias de IMNV/ μg de RNA, (C) Controle negativo com o cDNA substituído por água ultrapura e (D) Animais infectados.

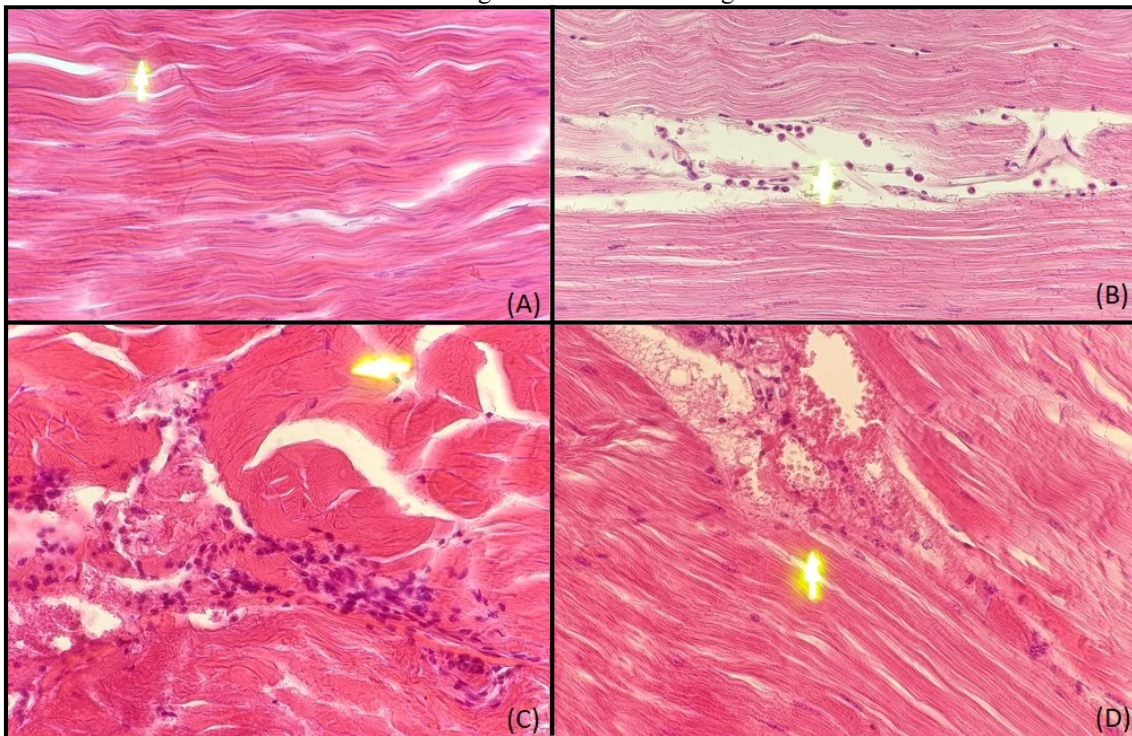
Tabela 2. Amplicons de 1ª e 2ª PCRs (nested-PCR) para IMNV em subadultos e adultos de *M. rosenbergii*.

		Positivos na 1ª PCR	Positivos na 2ª PCR		Positivos na 1ª PCR	Positivos na 2ª PCR
	Nº	Animais não infectados (%)	Animais não infectados (%)	Nº	Animais infectados (%)	Animais infectados (%)
G1*	9	0	0	17	9 (52,9%)	8 (47,1%)
G2**	9	0	0	17	13 (76,5%)	4 (23,5%)

*Grupo de animais subadultos. **Grupo de animais adultos. N°= Número de animais existentes em cada tratamento.

Quanto às lesões determinadas via análise histopatológica, foram observadas infiltrações hemocíticas e dilatação de seios na musculatura de animais experimentalmente inoculados com IMNV para ambos os grupos (G1 e G2), enquanto que, para o controle negativo (animais inoculados com solução salina a 0,85%), não foram determinadas quaisquer alterações teciduais (Figura 4).

Figura 4 – Cortes histológicos



Fonte: Autoral. Onde: (A) Corte histológico de *M. rosenbergii* adulto do controle negativo, sem alteração aparente na musculatura no 6º segmento abdominal direito. Coloração H.E. 400x; (B) Corte histológico de *M. rosenbergii* subadulto infectado com infiltração hemocítica discreta entre os feixes da musculatura no 6º segmento abdominal direito. Coloração H.E. 400x; (C) Corte histológico de um *M. rosenbergii* adulto infectado com intensa infiltração hemocítica entre os feixes da musculatura no 1º segmento abdominal direito. Coloração H.E. 400x e; (D) Corte histológico de *M. rosenbergii* adulto infectado, com dilatação no seio e discreto infiltrado hemocítico no 6º segmento abdominal direito. Coloração H.E. 400x.

Assim como descrito por Tang et al. (2005), as lesões simples e múltiplas observadas na análise hispatológica de *L. vannamei*, *L. stylirostris* e *Penaeus monodon* infectados por IMNV, são compatíveis com as encontradas em *M. rosenbergii*. Outras lesões, tais como: infiltrações hemocíticas, pequenas áreas com fibroses e focos de necrose coagulativas descritas por Poulos (2006), também foram encontradas em *M. rosenbergii* no presente estudo (Figura 4). O cruzamento dos dados de PCR e histopatologia constatam que o *M. rosenbergii* é sensível ao IMNV. Este é o primeiro trabalho a demonstrar a sensibilidade de subadultos e adultos de *M. rosenbergii* IMNV.

5. Conclusão

Diante dos resultados apresentados é possível afirmar que o *M. rosenbergii* é uma espécie sensível ao Vírus da Mionecrose Infecciosa. Desta forma, estudos voltados a outras rotas de infecção do IMNV em *M. rosenbergii* e ao monitoramento da presença deste vírus nos sistemas de cultivos, tornam-se cruciais para o entendimento da dinâmica desse patógeno no cultivo e, posterior, planos de gestão preventiva sanitária nas unidades produtivas.

Referências Bibliográficas

- Associação Brasileira Dos Criadores de Camarão (ABCC). **O Censo da carcinicultura nacional em 2011**. Rev. ABCC, v.15, n°1, p.24 – 28, 2013.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N.. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol chloroform extraction**. Anal. Biol. Chem. 162, p.156–159. 1987.
- CONFEDERAÇÃO DE AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). **Doenças de animais aquáticos de importância para o Brasil**. Manual de identificação no campo. p. 39 – 43. 2018.
Disponível em:
https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/guia_-_doencas_de_animais_aquaticos.pdf. Acesso em 7 julho 2019.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **FAO species catalogue. Shrimps and prawns of the world**. v. 1, 271 p. p. 103-104. Roma, 1980.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Farming freshwater prawns**. A manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). p.20. 2002.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. p. 17-23, 2018.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, (FUNASA). **Manual prático de análise de água**. 3ª ed. p.37. Brasília, 2009.
- HUNER, J. V. & BROWN, E. E. **Crustacean and Mollusk Aquaculture in United States**. AVI Publishing Company, INC. 476 p. Connecticut, 1985.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. v. 43, p. 49, 2015.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**. v. 44, p. 34. Rio de Janeiro, 2016.
- LIGHTNER, V. D.. **A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp**. cap 2. 1997.
- MELECHA, S. R.. **Commercial Pond Production of the Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, in Hawaii**. In: (ed) McVey. J. P. and MOORE J.R., CRC Handbook of Mariculture, VI Crustacean Aquaculture. 422 p. Flórida, 1983.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). **Aquatic Animal Health Code**. Twenty-first Edition, p. 161-166, 2018.

POULOS, B. T., LIGHTNER, D. V.. **Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)**. Diseases of Aquatic Organisms. Vol.73. p.69-72. 2006.

POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V. **Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp**. Journal of General Virology. 87: 987-996, 2006.

ROCHA, I. P..**Desenvolvimento tecnológico e perspectivas de crescimento da carcinicultura marinha brasileira**. In: Congresso Sul-Americano de Aqüicultura, 1º Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, 10º Simpósio Brasileiro de Camarões. Anais. p. 213-236. Recife/PE, 1998.

ROCHA, I. P. **Carcinicultura Brasileira: Desenvolvimento tecnológico, sustentabilidade ambiental e compromisso social**. Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC). nº1, p.16-22. Recife, 2007.

RODRIGUES, J. B. R. & ZIMMERMANN, S.. **Cultivo de Camarões em Água Doce**. In: (ed) POLI, C. R.. Aquacultura: Uma Introdução para os Cursos de Graduação. Florianópolis, 1996.

SEBRAE/ES. **“TECNOLOGIA DE CRIAÇÃO DO CAMARÃO DA MALÁSIA” (Macrobrachium rosenbergii)**. MANUAL DE CARCINICULTURA DE ÁGUA DOCE. cap.9 p.43. Vitória/ES, 2005.

SILVA, S. M. B. C.; ROCHA, J. L.; MARTINS, P. C. C.; SANTOS, F. L. S., GÁLVEZ, A. O., ANDRADE, H. A., COIMBRA, M. R. M.. **Experimental infection of infectious myonecrosis virus (IMNV) in the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)**. Aquacult Int. 23:563–576. 2015.

TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V.. **In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV)**. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS. Vol. 63: 261–265, 2005.

WILCZYNSKI, S. P.. In: (ed) WEIDNER, N.; COTE, R. J.; SUSTER, S; WEISS, L. M.. **Modern Surgical Pathology**. Second Edition. cap. 7. p.85-120. Philadelphia, 2009.

ZIMMERMANN, S.. In: (ed) VALENTI, W. C.. **Carcinicultura de água doce**. Tecnologia para produção de camarões. cap. 10. p.191-215. Brasília, 1998.

ZIMMERMANN, S.. In: (ed) VALENTI, W. C.. **Carcinicultura de água doce**. Tecnologia para produção de camarões. cap. 11. p.217-238. Brasília, 1998.